

**НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ ФІЗІОЛОГІЇ ІМ. О.О. БОГОМОЛЬЦЯ**

Чернобривцев Олександр Петрович

УДК 616.379-008.61:611.018.74:575

**РОЛЬ ГЕНЕТИЧНОГО ПОЛІМОРФІЗМУ У РОЗВИТКУ
ЕНДОТЕЛІАЛЬНОЇ ДИСФУНКЦІЇ
ПРИ ЦУКРОВОМУ ДІАБЕТИ 2-го ТИПУ**

14.03.04 – патологічна фізіологія

АВТОРЕФЕРАТ

дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата медичних наук

Київ – 2019

Дисертацією є рукопис.

Робота виконана у Національному медичному університеті імені О.О. Богомольця МОЗ України.

Науковий керівник: доктор медичних наук, професор,
Зябліцев Сергій Володимирович,
Національний медичний університет
імені О.О. Богомольця МОЗ України,
професор кафедри патофізіології.

Офіційні опоненти: доктор медичних наук, старший
науковий співробітник,
Портніченко Алла Георгіївна
Міжнародний центр астрономічних та
медіко-екологічних досліджень НАН України
заступник директора з наукової роботи.

доктор медичних наук, професор,
Савицький Іван Володимирович
ДВНЗ «Одеський національний медичний
Університет МОЗ України», професор
кафедри загальної та клінічної патологічної
фізіології ім. В.В. Подвисоцького.

Захист дисертації відбудеться 15 жовтня 2019 р. о 14.00 годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 26.198.01 при Інституті фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України за адресою 01024, м. Київ, вул. Богомольця, 4.

Із дисертацією можна ознайомитись у бібліотеці Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України за адресою 01024, м. Київ, вул. Богомольця, 4
та на сайті Інституту http://biph.kiev.ua/en/Specialized_Scientific_Council

Автореферат розісланий 13 вересня 2019 р.

Вчений секретар
спеціалізованої вченої ради
кандидат біологічних наук

Любанова О.П.

ВСТУП

Актуальність теми. Цукровий діабет 2-го типу (ЦД2Т) небезпідставно розглядають як пандемію ХХІ сторіччя (Паньків В.І., 2013; Тронько М.Д. та співав., 2015). Згідно з Міжнародною федерацією діабету кількість хворих у світі зараз складає понад 360 мільйонів. За прогнозами експертів до 2030 року їх кількість збільшиться майже вдвічі. При ЦД2Т інвалідизація хворих внаслідок розвитку діабетичних ускладнень розвивається дуже швидко (Маньковський Б.М., 2014). Найбільш поширеними ускладненнями діабету є судинні (макро- та мікроангіопатії), а тяжкість захворювання пов'язана саме з їх наявністю (Паньків В.І., 2013; IDF Diabetes Atlas, 2018).

З'ясування ролі судинного ендотелію розвивалось протягом останніх двох десятиліть та дійшло до розуміння того, що він є динамічною регулюючою системою та відіграє ключову роль у багатьох фізіологічних та патологічних процесах (Blum A. et al., 2016; Pi X. et al., 2018). Ендотеліальні клітини виконують бар'єрну роль та забезпечують активну регуляцію тону судин, параметрів кровообігу і функціонального стану тромбоцитів (Кузнецова А.С. та співав., 2018; Carrizzo A. et al., 2018; Cutiongco M.F. et al., 2018). При ЦД2Т розгортається цілий каскад патологічних реакцій у ендотелії судин: його клітини потерпають від глюкозотоксичності, надмірної дії стимулюючих гіпертензивних та запальних факторів, активаторів тромбоутворення, інтенсифікації окисно/нітрозативного стресу (Babik B. et al., 2018; Raminderjit K. et al., 2018; Bermejo-Martin J.F. et al., 2018). Пошкодження ендотелію включається в патогенез ЦД2Т, що обумовлює розвиток подальших порушень (DeFronzo R.A. et al., 2015). Основними чинниками ендотеліальної дисфункції (ЕДФ) є гормон ендотелію ендотелін-1 (ET1), оксид азоту (NO), ендотеліальна NO-синтаза (eNOS), фактор некрозу пухлин- α (TNF α), а також маркери окисного стресу і ліпопероксидації, яким є дієнові кон'югати (ДК) (Мойбенко О.О. та співав., 2004; Knapp M. et al., 2018; Polovina M.M., et al., 2014).

У останніх дослідженнях показано важливу роль генетичних факторів, які сприяють виникненню ЦД2Т. Розроблено генетичний атлас, який був складений шляхом інтегративного аналізу 650 генів і 34 мікроРНК, пов'язаних з цим захворюванням та його ускладненнями, з використанням бази Gene Expression Omnibus (Rani J. et al., 2017). У цьому аспекті привернув увагу поліморфізм *rs1799983* гена *NOS3*, мінорна алель *T* якого асоційована із зниженням активності eNOS (Sadati S.M. et al., 2018). Числені літературні дані, а також аналіз результатів власних досліджень (загалом 4795 випадків та 3805 контролів) дозволили O. Tabatabaei-Malazy et al., (2017) переконливо довести зв'язок цього поліморфізму з ЦД2Т. У багатьох дослідженнях (Jamil K. et al., 2017; Nadeem A. et al., 2017; Sesti L.F. et al., 2015) була показана наявність асоціації поліморфізму *rs1800629* гена *TNF α* з розвитком ЦД2Т та його ускладненнями. У системному огляді публікацій 2000 - 2016 р. G.I. Luna et al. (2016) було звернуто увагу на істотних відмінностях результатів визначення впливу цього поліморфізму у різних популяціях, що може бути пов'язане з етнічними розходженнями та диктує необхідність

відповідних досліджень у кожній популяції. Результати Li W. et al., (2018) переконливо показали, що ЕДФ та система ET1 і його рецепторів бере активну участь у розвитку діабетичних судинних ускладнень. При ЦД2Т була виявлена підвищена експресія ET1 і його рецепторів типу A, що корелювало зі ступенем нефропатії (Zanatta C.M. et al., 2015). Показано зв'язок поліморфізмів гена *EDNRB* з розвитком діабетичної ретинопатії (Bregar D. et al., 2018).

У той же час конкретні механізми розвитку ЕДФ та її патогенетичні чинники висвітлені недостатньо, неясно чому у одного пацієнта прогресує переважно ретинопатія, а у другого, з аналогічними клініко-лабораторними показниками – нефропатія (Прохоров Є.В., 2014). Таким чином, дослідження ролі генетичного поліморфізму у розвитку ЕДФ при ЦД2Т, яке включало б комплексну оцінку тяжкості та ускладнень захворювання, оцінку значення чинників ЕДФ та відповідних генетичних факторів є своєчасним та актуальним науковим завданням.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертаційна робота є фрагментом науково-дослідної роботи кафедри патологіології Національного медичного університету імені О.О. Богомольця МОЗ України «Роль генетичних поліморфізмів у патогенезі метаболічних порушень при цукровому діабеті 2 типу» (№ держреєстрації 0115U005799) та прикладної науково-дослідної роботи МОЗ України «Вивчити значення генетичних чинників та зовнішніх впливів у розвитку і прогресуванні мікроциркуляторних ускладнень при цукровому діабеті 2 типу» (№ держреєстрації 0118U001214). Дисертант є співвиконавцем цих робіт.

Мета дослідження. Встановити роль генетичних поліморфізмів (*rs1799983* гена *NOS3*, *rs1800629* гена *TNF α* , *rs6842241* гена *EDNRA* і *rs5351* гена *EDNRB*) у розвитку ендотеліальної дисфункції при ЦД2Т.

Завдання дослідження:

1. Вивчити клініко-лабораторні показники перебігу ЦД2Т у групах хворих, виділених згідно до тяжкості захворювання.

2. Вивчити частоту та ступень діабетичних ускладнень (ретинопатії, полінейропатії, нефропатії, макроангіопатії нижніх кінцівок та артеріальної гіпертензії) по групах хворих; розробити інтегральний індекс оцінки тяжкості хвороби.

3. Вивчити вміст у крові чинників ЕДФ (ET1, NO, eNOS, TNF α , та ДК) по групам хворих; проаналізувати їх вплив на клініко-лабораторні показники перебігу захворювання та вплив на розвиток діабетичних ускладнень; шляхом багатофакторної логістичної регресії побудувати моделі прогнозування розвитку ускладнень.

4. Визначити розподіл частот алелей і генотипів *rs1799983* гена *NOS3* і ступінь їх зв'язку з розвитком захворювання, показниками його перебігу та розвитком діабетичних ускладнень.

5. Визначити розподіл частот алелей і генотипів *rs1800629* гена *TNF α* і ступінь їх зв'язку з розвитком захворювання, показниками його перебігу та розвитком діабетичних ускладнень.

6. Визначити розподіл частот алелей і генотипів генів ендотелінових рецепторів (*rs6842241* гена *EDNRA* та *rs5351* гена *EDNRB*) і ступінь їх зв'язку з розвитком захворювання, показниками його перебігу та розвитком діабетичних ускладнень.

7. Розраховувати ймовірності розвитку та межові значення позитивного прогнозу для діабетичних ускладнень в залежності від генотипів вивчених поліморфізмів; розробити математичну модель прогнозу тяжкості перебігу ЦД2Т за індексом тяжкості хвороби з урахуванням поліморфних генотипів та чинників ЕДФ.

Об'єкт дослідження – ендотеліальна дисфункція при ЦД2Т.

Предмет дослідження – поліморфізми генів, що регулюють функцію ендотелію (*rs1799983* гена *NOS3*, *rs1800629* гена *TNF α* , *rs6842241* гена *EDNRA* і *rs5351* гена *EDNRB*); вміст у крові чинників ЕДФ (ЕТ1, NO, eNOS, TNF α , та ДК); клініко-лабораторні показники перебігу ЦД2Т та його ускладнень.

Методи дослідження – клінічні (загальне клінічне обстеження хворих), біохімічні (вміст у крові стабільних метаболітів NO (NO x), ДК, глюкози, глікованого гемоглобіну (HbA1c), сечовини, креатиніну, холестерину, ліпопротеїнів низької щільності, тригліцеридів), імуноферментні (вміст у крові ЕТ1, eNOS, TNF α , інсуліну, лептину та альбуміну в сечі), молекулярно-генетичні (визначення *rs1799983* гена *NOS3*, *rs1800629* гена *TNF α* , *rs6842241* гена *EDNRA* і *rs5351* гена *EDNRB*); математичні (варіаційний, непараметричний, одно- і багатофакторний регресійний аналізи).

Наукова новизна одержаних результатів. Доповнено та уточнено дані щодо перебігу захворювання та наявності ускладнень у хворих на ЦД2Т різних ступенів тяжкості. Показано, що при середньому ступені тяжкості захворювання у хворих спостерігалась гіперінсулінемія та інсулінорезистентність, тоді як при важкому ступені – гіпоінсулінемія та зниження функції бета-клітин підшлункової залози. Зайва маса тіла або ожиріння були пов'язані з тригліцеридемією, лептинорезистентністю і гіперлептинемією. Вперше запропоновано оригінальний індекс тяжкості хвороби (ІТХ), величина якого відображала тяжкість перебігу захворювання – прямо залежала від кількості та тяжкості ускладнень і зворотно – від віку пацієнта.

Вперше показано взаємопов'язані зміни вмісту в крові чинників ЕДФ (багаторазовий приріст ЕТ1, NO x , TNF α , ДК при зниженні вмісту eNOS) та математично доведено роль окремих чинників ЕДФ у формуванні ключових порушень клініко-лабораторних показників ЦД2Т. Уточнено дані, щодо впливу чинників ЕДФ на розвиток окремих діабетичних ускладнень, та розраховано їх критичні (сигнальні) рівні у крові, асоційовані з наявністю ускладнень.

Вперше доведено, що в когорті українських хворих розподіл поліморфних алелей вивчених генів впливав на наявність ЦД2Т. Показано, що наявність у пацієнтів мінорного алеля *T rs1799983* гена *NOS3*; мінорного алеля *A rs1800629* гена *TNF α* ; мінорного алеля *A rs6842241* гена *EDNRA* і

предкового алеля *C rs5351* гена *EDNRB* збільшувало шанси розвитку діабету, сприяло його декомпенсації та прогресуванню. Встановлено, що певні поєднання ризикових алелей у генотипі пацієнтів впливали на вміст у крові чинників ЕДФ та визначали характер і тяжкість діабетичних ускладнень. Розраховано ймовірності розвитку та межові значення позитивного прогнозу для діабетичних ускладнень за наявністю того чи іншого генотипу.

Практичне значення одержаних результатів. Побудовано багатофакторні регресійні моделі прогнозування ймовірності розвитку діабетичних ускладнень за генотипом: ретинопатія визначалась генотипом *rs1800629* і *rs5351*, полінейропатія – *rs1799983* і *rs5351*, діабетична нефропатія за швидкістю клубочкової фільтрації – *rs1799983*, *rs1800629* і *rs5351*, діабетична нефропатія за рівнем альбумінурії і артеріальна гіпертензія – *rs1799983*, *rs6842241* і *rs5351*, макроангіопатія нижніх кінцівок – *rs1799983* і *rs1800629*. Розроблено математичну модель прогнозу тяжкості перебігу ЦД2Т за ІТХ, яка включала значущі комбінації генотипів та маркери ЕДФ. За питомим внеском ці фактори розподілись таким чином: $ET1 > NOx > rs5351 > rs6842241 > rs1799983 > TNF\alpha$. Прогресування діабету, розраховане за прогнозом, розцінювалось як повільне при ІТХ менше за 2,7 ум.од., помірне – 2,7-7,0 ум.од. і швидке – 7,1-11,3 ум.од. Побудовано моделі прогнозування розвитку ускладнень в залежності від вмісту маркерів ЕДФ: для ретинопатії мали значення рівні $ET1$ і $TNF\alpha$; для макроангіопатії нижніх кінцівок – NOx і $TNF\alpha$; для полінейропатії – $ET1$; для нефропатії за швидкістю клубочкової фільтрації – $ET1$ і $TNF\alpha$; для нефропатії за альбумінурією – $ET1$ і $eNOS$; для артеріальної гіпертензії – $ET1$, NOx і $TNF\alpha$). Розраховано критичні рівні у крові маркерів ЕДФ: вміст $ET1$ вищий за 1,990 фмоль/мл підтверджував розвиток нефропатії за рівнем альбумінурії, а вище за 2,309 фмоль/мл – інших ускладнень. Збільшення вмісту у крові $TNF\alpha$ вище за 102,0 пг/мл і 105,1 пг/мл характеризувало розвиток ретинопатії та нефропатії, відповідно. Розвиток нефропатії за рівнем альбумінурії, крім $ET1$, підтверджувало зменшення вмісту у крові $eNOS$ нижче за 250,4 пг/мл та ДК нижче за 5,368 Од./мл.

Результати роботи впроваджено в науковий процес Інституту фізіології імені О.О. Богомольця НАН України; учбовий процес на кафедрах патофізіології в Національному медичному університеті імені О.О. Богомольця МОЗ України, Одеському національному медичному університеті МОЗ України, ВДНЗУ «Українська медична стоматологічна академія» МОЗ України, ДВНЗ «Тернопільський державний медичний університет імені І. Горбачевського» МОЗ України, Запорізькому державному медичному університеті МОЗ України, Харківському національному медичному університеті МОЗ України, Медичному інституті Сумського державного університету МОН України, Івано-Франківському національному медичному університеті МОЗ України та на кафедрі патологічної та топографічної анатомії Національній академії післядипломної освіти імені П.Л. Шупика МОЗ України.

Особистий внесок здобувача. Визначення мети і завдань дослідження, узагальнення отриманих результатів і висновків здійснено автором роботи разом із науковим керівником. Участь здобувача в отриманні результатів дослідження є основною і полягає в розробці наукової концепції дисертації, аналізі літературних джерел за темою, реалізації патентного пошуку. Самостійно проведено обстеження хворих та лабораторну частину роботи на базі НДІ експериментальної та клінічної медицини Національного медичного університету імені О.О. Богомольця МОЗ України (директор – д.мед.н., проф. Л.В. Натрус). Автор самостійно провів математичний аналіз отриманих цифрових результатів дослідження. Дисертантом не було використано результати та ідеї співавторів публікацій, що не входять до спільних робіт.

Апробація результатів дисертації. Дисертаційну роботу апробовано на апробаційному семінарі з теоретичних дисциплін НМУ імені О. О. Богомольця МОЗ України (15 квітня 2019 р.). Основні положення дисертаційної роботи оприлюднені і обговорені на: VII національному конгресі патофізіологів України з міжнародною участю «Патофізіологія і фармація: шляхи інтеграції» (5-7 жовтня 2016 р., м. Харків); Всеукраїнській науково-практичній конференції з міжнародною участю «Фізіологія і патологія нейроімуноендокринної регуляції», присвяченій 105-й річниці від дня народження професора Я.Д. Киршенבלата (5-6 жовтня 2017 р., м. Чернівці); XVI та XVII читаннях імені В.В. Подвисоцького (2017, 2018 рр., м. Одеса); VII Пленумі Українського наукового товариства патофізіологів «Інтегративні механізми патологічних процесів» (10-12 жовтня, 2018 р., м. Полтава); XX з'їзді Українського фізіологічного товариства ім. П.Г. Костюка з міжнародною участю, присвяченого 95-річчю від дня народження академіка П.Г. Костюка (2019 р., м. Київ).

Публікації. За темою дисертації опубліковано 19 наукових робіт, серед яких 12 статей у журналах, рекомендованих МОН України і 7 – в матеріалах наукових форумів.

Структура й обсяг дисертації. Дисертацію викладено українською мовою на 214 сторінках тексту, що включає в себе вступ, 7 розділів (у тому числі огляд літератури, опис матеріалів і методів, 4 розділів опису результатів власних досліджень, узагальнення й аналіз отриманих результатів), висновки, практичні рекомендації, список використаних джерел літератури, що містить 254 найменування. Роботу ілюстровано 67 таблицями та 36 рисунками.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

Матеріали і методи дослідження. До дослідження було залучено дані 152 хворих з ЦД2Т, що перебували на стаціонарному лікуванні у відділенні ендокринології Донецького обласного клінічного територіального медичного об'єднання у 2013-2014 р.р. та на базі Українського науково-дослідного центру ендокринної хірургії, трансплантації ендокринних органів і тканин МОЗ України у 2015-2016 р.р. Вік пацієнтів склав від 34 до 80 років, у середньому ($M \pm SD$) $53,9 \pm 8,4$ років. Жінок було 95 (62,5 %), чоловіків – 57

(37,5 %). За тривалістю захворювання пацієнти розподілились таким чином: до 1 року – 5 (3,3 %), від 1 до 3 років – 40 (26,3 %), від 4 до 5 років – 23 (15,1 %), від 6 до 7 років – 12 (7,9 %), від 8 до 10 років – 31 (20,4 %), від 11 до 15 років – 26 (17,1 %) і більше 15 років – 15 (9,9 %) хворих. Перший ступінь тяжкості не був виявлений у жодного пацієнта, 2-й ступінь – у 120 (78,9 %) та 3-й ступінь – у 32 (21,1 %) хворих. Пацієнтів із 2-м ступенем тяжкості було розподілено на 2 групи: 1-у – 57 (37,5 %) та 2-у – 63 (41,4 %) хворих. Критерієм для їх розподілу було обрано ступінь компенсації цукрового діабету за рівнем HbA_{1c}: в 1-у групу були залучені хворі, які знаходились в стані компенсації або задовільної компенсації рівня гіперглікемії; в 2-у – в стані декомпенсації. Хворі з 3-м ступенем тяжкості склали 3-ю групу. До контрольної групи було залучено 95 практично здорових чоловіків і жінок, які не мали порушень вуглеводного обміну і клінічної маніфестації мікро- і макросудинних ускладнень. Їх вік був від 35 до 76 років ($53,7 \pm 11,3$ років). Жінок було 58 (61,0 %), чоловіків – 37 (38,9 %). Порівняння за віком і статтю не виявило вірогідних різниць з хворими ($p=0,916$ і $p=0,820$, відповідно).

При роботі з пацієнтами дотримані сучасні вимоги морально-етичних норм ІСН GCP, Гельсінської декларації (1964 р.) та положень законодавчих актів України. У всіх обстежених осіб було отримано інформовану згоду на участь в дослідженні. Критеріями виключення хворих з дослідження були: наявність гострих діабетичних, атеросклеротичних та/або ішемічних ускладнень, розвиток гострих інфекційних, аутоімунних та алергійних захворювань під час або до обстеження; неможливість для хворого чи його небажання продовжувати участь в обстеженні, а також соціальні протипоказання (вагітність, наявність важких невиліковних захворювань, порушення психіки та ін.).

Діагноз ЦД2Т був встановлений відповідно до «Уніфікованого клінічного протоколу первинної та вторинної (спеціалізованої) медичної допомоги «Цукровий діабет 2 типу», затвердженого Наказом МОЗ України від 21.12.2012 р. за №1118. Ступінь важкості ЦД2Т оцінювалась за критеріями відсутності або наявності у хворих макро- і мікросудинних ускладнень, а також, у разі наявності цих ускладнень – їх ступенів тяжкості (Паньків В.І., 2013). За результатами клініко-лабораторних обстежень, лікарів-спеціалістів з ендокринології, офтальмології, невропатології, терапії і хірургії визначали наявність і ступені ретинопатії, полінейропатії, нефропатії, макроангіопатії нижніх кінцівок та артеріальної гіпертензії. Всім пацієнтам виконували манжеткову пробу Румпеля-Леєде-Кончаловського (РЛК), результати якої використовували для функціональної оцінки стану ендотелію (Синяченко О.В., 2012; Rürup C. et al., 1979).

Забір крові здійснювали вранці натщесерце з кубітальної вени в кількості 4-5 мл в вакуумні пробірки з K₂ЕДТА та без нього. Сечу для визначення глюкозурії і альбумінурії збирали протягом доби в пластиковий контейнер, який зберігали при температурі 4-6°C.

Біохімічні дослідження для визначення концентрації в сироватці крові глюкози, HbA_{1c}, креатиніну, сечовини, холестерину, ліпопротеїнів низької

щільності, тригліцеридів, а також вмісту глюкози в сечі проводили на автоматичному аналізаторі RT-200C plus (Rayto, Китай) з використанням відповідних реактивів Audit Diagnostics (Ірландія). Перераховані вище дослідження (за виключенням HbA1c) виконували також на біохімічному аналізаторі Sinnowa BS-3000M (Sinnowa Medical Science&Technology, Китай) з використанням реактивів Diagnosticum Zrt, (Угорщина). Вміст HbA1c в крові визначали також на автоматичному аналізаторі гемоглобіну «D 10™» (Bio-Rad Laboratories, США).

NO у сироватці крові оцінювали за сумарним рівнем його стабільних метаболитів (NOx) – нітритів (NO₂⁻) і нітратів (NO₃⁻). Відновлення NO₃⁻ до NO₂⁻ в інкубаційному середовищі здійснювали за допомогою хлористого ванадію (Miranda K.M. et al., 2001). Визначення проводили із застосуванням реактиву Гріса (Голиков П.П. та співав., 2000). Визначення ДК в плазмі крові засноване на вимірі піку поглинання екстракту кон'югатів дієнових структур гідроперекисів ліпідів в гептан-ізопропіловій суміші (Гаврилов В.Б. та співав., 1983). Оптичну щільність розчинів під час біохімічних досліджень рівня оксиду азоту і дієнових кон'югатів вимірювали на приладі «SPECORD-200» (Німеччина).

Імуноферментним методом у плазмі крові визначали вміст інсуліну і лептину (DRG, США), а також чинників ЕДФ: ET1 (Biomedica Immunoassays, Австрія), eNOS (R&D Systems, США) і TNFα (Bender Medsystems, Австрія). У сечі визначали концентрацію альбуміну за допомогою імуноферментного методу з використанням наборів DRG (США).

Методом полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) здійснювали виявлення поліморфізмів *rs1799983* гена *NOS3* (генна локалізація *7q36.1*), *rs6842241* гена *EDNRA* (генна локалізація *4q31.22*) і *rs5351* гена *EDNRB* (генна локалізація *13q22.3*). На першому етапі дослідження проводили виділення геномної ДНК з цільної венозної крові з використанням стандартних реактивів «PureLink® Genomic DNA Kit For Purification of Genomic DNA»; виробник Invitrogen (США). На другому етапі проведено ПЛР у реальному часі з використанням уніфікованих тест-систем «TaqMan Mutation Detection Assays» Life-Technology (США) в автоматичному ампліфікаторі Gene Amp® PCR System 7500 (Applied Biosystems, США). Аналіз поліморфізму *rs1800629* гена *TNFα* (SNP у промоторному регіоні - 308G/A; генна локалізація *6p21.33*) проведено методом ПЛР з подальшою електрофоретичною детекцією продуктів ампліфікації. Виділення геномної ДНК з цільної венозної крові проводили з використанням стандартних реактивів «ДНК-експрес-кров» НПФ «Літех», (РФ). Як набір реагентів для ампліфікації застосовували «SNP-експрес, TNF G-308A» НПФ «Літех» (РФ). Детекцію алель-специфічних фрагментів ДНК здійснювали після горизонтального електрофорезу в 3 % агарозному гелі (напруженість електричного поля 10 В/см) і забарвлення бромистим етидієм в прохідному ультрафіолетовому світлі (довжина хвилі 312 нм) в транслюмінаторі «TFX-20 M» («Vilber Lourmat», Франція).

Значення ІТХ (ум. од.) розраховували за формулою:

$$ITX = (\sum_{i=1}^n CTU_i) / B * 100 \quad (1),$$

де: *CTU* – ступені тяжкості діабетичних ускладнень наявних у пацієнта;
B – вік пацієнта (років).

Статистичну обробку отриманих даних виконували з використанням комп'ютерної програми Statistica 10 (StatSoft, США). Для описової статистики використовували медіану (*Me*) та перший і третій квартилі (*Q1*; *Q3*). Дві незалежні вибірки даних порівнювали із застосуванням критерію Манна-Уїтні (*U*), три і більше вибірок – за допомогою рангового дисперсійного аналізу Краскала-Уолліса (*H*). Для порівняння частот категоріальних змінних використовували непараметричні критерії хі-квадрат (χ^2) Пірсона в модифікації Єйтса і двосторонній точний метод Фішера. Значущість відмінностей між групами приймали при $p < 0,05$. Ступінь асоціації генотипів і алелей з захворюванням визначали за величиною відношення шансів (*ВШ*) з розрахунком критерію χ^2 . Статистичну значущість ризику підтверджувала величина *ВШ* більше одиниці, за тієї умови, що вона потрапляла в довірчий інтервал (95% ДІ). Вивчення впливу факторних змінних на залежні, а також розробка математичних моделей виконувалась з використанням лінійного та логістичного, одно- і багатофакторного регресійного аналізів в обчислювальних середовищах GLZ і GRM. Розраховували коефіцієнти регресії (β) та значущість їх відмінностей від нульової гіпотези. Для оцінки адекватності побудованих лінійних моделей розраховували коефіцієнти множинної кореляції (*R*) і детермінації (R^2), а також критерій *F*. Про адекватність логістичних моделей судили за діаграмами операційних характеристик (*ROC*), розраховували площу під *ROC*-кривою (*AUC*), *Wald* статистику, коефіцієнти максимальної правдоподібності ($-2 * \log$) та χ^2 .

Результати дослідження та їх обговорення. Для об'єктивізації оцінки тяжкості захворювання нами був запропонований ІТХ (див. формулу 1). Величина цього індексу є відношенням сумарної ступені тяжкості всіх діабетичних ускладнень, наявних у пацієнта, до його віку. Отже, ІТХ зворотно залежав від віку й прямо – від наявності та ступеню ускладнень. У хворих 1-ї та 2-ї груп ІТХ суттєво не розрізнявся, тоді як у хворих 3-ї групи він був вищим (у три рази; $p < 0,001$).

Частота і ступінь артеріальної гіпертензії достеменно збільшувались по групам хворих ($p = 5,2e-05$). Всі хворі мали гіперглікемію, причому 1-й та 2-й ступені компенсації були виявлені тільки у хворих 1-ї групи. Гіперглікемія 3-го ступеня відносно однаково розподілялась у хворих всіх груп, причому більшість пацієнтів мали саме 3-й ступінь компенсації за рівнем глюкози. Гіперглікемія 4-ї і 5-ї ступенів частіше виявлялась у хворих 2-ї та 3-ї груп ($p = 1,8e-04$). Загалом, розподіл пацієнтів за групами відповідав ступеню компенсації діабету за рівнем глікемії та *HbA1c*. Ключова різниця для подальшої оцінки 1-ї і 2-ї груп відзначалась за ступенем компенсації гіперглікемії у хворих із середнім ступенем тяжкості ЦД2Т. У 1-й групі

пацієнти були компенсовані, тоді як у 2-й і 3-й групах – некомпенсовані. У пацієнтів 1-ї і 2-ї груп мала місце гіперінсулінемія, у 3-й групі – гіпоінсулінемія та зниження функції бета-клітин підшлункової залози. У хворих всіх груп була наявна інсулінорезистентність, підтверджена розрахунками індексу інсулінорезистентності (НОМА-ІР). У хворих 3-ї групи формувалась абсолютна інсулінова недостатність, яку відображав суттєво знижений індекс функції бета-клітин (НОМА-ФБК).

Зв'язок ожиріння з ЦД2Т є загально відомим (Панків В.І., 2013). У нашому дослідженні ІМТ максимального збільшення сягав у хворих 3-ї групи, тобто за наявності декомпенсації та діабетичних ускладнень. Майже всі хворі цієї групи мали зайву масу тіла або ожиріння (ІМТ від 28,4 кг/м² до 35,0 кг/м²), що можна було зв'язати з гіпертригліцеридемією і лептинорезистентністю (рівень лептину ставав поступово більшим по групах, досягаючи максимуму у 3-й групі хворих). Вміст у крові сечовини і креатиніну був збільшеним ($p < 0,001$), що відображало розвиток нефропатії; також була наявна діабетична поліурія; рівні глюкозурії і альбумінурії сягали максимальних значень в 2-й і 3-й групах ($p < 0,001$).

Найчастішим ускладненням у дослідженій вибірці пацієнтів була сенсорна полінейропатія (88,1 % хворих), високою була розповсюдженість нефропатії (84,2 %) та ретинопатії (78,3 %). Артеріальна гіпертензія була виявлена у 46,7 % хворих, а макроангіопатія нижніх кінцівок – у 21,0 %. По групах значуще відрізнялись частоти ретинопатії ($p = 5,8e-04$), нефропатії за альбумінурією ($p = 0,032$), макроангіопатії нижніх кінцівок ($p < 0,001$) та артеріальної гіпертензії ($p = 0,004$).

Рівень ET1 у групах хворих статистично значуще перевищував контроль (у 3,7-4,7 рази). З розвитком захворювання в цілому була відмічена тенденція до високих значень ET1. Рівень NOx також був високим, але це не залежало від тяжкості захворювання. Наявність статистично значущої різниці між всіма групами підтвердило зв'язок між розвитком ЦД2Т і зниженням вмісту eNOS у крові, що можна розглядати як біомаркер розвитку окисного стресу і інсулінорезистентності (Banerjee M. et al., 2014). Вміст у крові TNF α багаторазово перевищував контроль, особливо у 3-й групі, що показувало залежність активації цитокінового каскаду від тяжкості ЦД2Т. ДК накопичувались у крові, що вказувало на інтенсифікацію окисного стресу. Отже, були встановлені певні закономірності розвитку ЕДФ при збільшенні тяжкості ЦД2Т. Рівні у крові ET1, TNF α , NOx та ДК були багаторазово вірогідно збільшеними, а вміст eNOS – зниженим, що корелювало зі ступенем тяжкості патологічного процесу.

Для з'ясування впливу чинників ЕДФ на клініко-лабораторні показники було виконано серію однофакторних регресійних обчислювань. Для ET1 найбільший вплив виявлено щодо ступеня глікемії ($F = 8,431$; $p = 0,008$) і ступеню компенсації ЦД по HbA1c ($F = 8,322$; $p = 0,008$). Також був виявлений досить сильний вплив на ступінь компенсації діабету за глікемією ($F = 4,832$; $p = 0,037$) і на результати проби РЛК ($F = 7,541$; $p = 0,011$). Відмічений вірогідний вплив ET1 на ступінь нефропатії за альбумінурією ($F = 7,011$;

$p=0,014$) та рівень самої альбумінурії ($F=5,524$; $p=0,027$). Серед інших чинників ЕДФ ЕТ1 мав зворотній зв'язок з рівнем eNOS ($F=17,33$; $p=0,001$) та прямий – з ДК ($F=11,93$; $p=7,2e-04$). Отже приріст вмісту у крові ЕТ1 обумовлював високу глікемію, альбумінурію та підвищував ступені декомпенсації діабету і діабетичної нефропатії.

Для NOx було прослідковано зв'язки з віком хворих ($F=7,005$; $p=0,014$) та ступенем нефропатії за швидкістю клубочкової фільтрації ($F=5,672$; $p=0,025$), а також з низкою біохімічних показників: рівнями у крові тригліцеридів ($F=10,443$; $p=0,003$), сечовини ($F=5,813$; $p=0,024$) та креатиніну ($F=4,356$; $p=0,047$). Те, що NOx зворотно корелювали з швидкістю клубочкової фільтрації ($F=4,536$; $p=0,043$) пояснювало такі зв'язки. Середчинників ЕДФ вміст NOx був сильно пов'язаний з рівнями TNF α ($F=30,15$; $p=1,7e-07$) і ДК ($F=34,08$; $p=3,2e-08$). Отже, можна вважати, що накопичення NOx у крові в першу чергу пов'язане зі зниженням швидкості клубочкової фільтрації та погіршенням функції нирок.

Для вмісту eNOS вагомий вплив виявлявся щодо рівня HbA1c ($F=8,951$; $p=0,006$), ступеня компенсації діабету за HbA1c ($F=17,567$; $p<0,001$), ступеня нефропатії за рівнем мікроальбумінурії ($F=5,749$; $p<0,024$), ступеня діабетичної полінейропатії ($F=5,498$; $p<0,027$) і результатів проби РЛК ($F=5,671$; $p=0,025$). З інших чинників ЕДФ, зворотні зв'язки відмічались для рівнів ЕТ1 ($F=17,33$; $p=5,3e-05$) і TNF α ($F=4,00$; $p=0,047$). Отже, вплив зниження рівня eNOS був пов'язаний зі зниженням компенсації діабету за HbA1c та прогресуванням нефро- і полінейропатії.

Для TNF α було виявлено вплив на тривалість захворювання ($F=7,674$; $p=0,01$), ступінь нефропатії ($F=11,298$; $p=0,002$), швидкість клубочкової фільтрації ($F=9,606$; $p=0,005$), результати проби РЛК ($F=9,352$; $p=0,005$), низку метаболічних показників (HbA1c, тригліцериди, сечовина, креатинін; для всіх $p<0,001$) та рівень альбумінурії ($F=4,609$; $p=0,042$), а також на наявність макроангіопатії нижніх кінцівок ($F=14,034$; $p=0,001$) і ретинопатії ($F=7,545$; $p=0,011$). З інших чинників ЕДФ, TNF α мав щільні прямі зв'язки з NOx ($F=30,15$; $p=1,7e-07$) та ДК ($F=19,326$; $p=2,1e-05$) і зворотній зв'язок з eNOS ($F=4,002$; $p=0,047$). Отже, TNF α комплексно впливав на майже всі ключові показники ЦД2Т і чинники ЕДФ.

Для ДК були виявлені зв'язки із тривалістю хвороби ($F=9,173$; $p=0,006$) та наявністю макроангіопатії нижніх кінцівок ($F=9,885$; $p=0,004$). Цікавим було виявлення впливу на рівень інсуліну у крові ($F=9,361$; $p=0,005$), результати проби РЛК ($F=8,132$; $p=0,009$) та рівень НОМА-ІР ($F=9,372$; $p=0,005$). Синергізм патологічного впливу з іншими чинниками ЕДФ був підтверджений наявністю позитивного зв'язку з ЕТ1 ($F=11,935$; $p=7,2e-04$), NOx ($F=34,08$; $p=3,2e-08$) та TNF α ($F=19,33$; $p=2,1e-05$). Отже, як і TNF α , ДК визначав тяжкість та ускладнення ЦД2Т та демонстрував спільну дію з іншими чинниками ЕДФ.

У хворих на ЦД2Т з української популяції розподіл алелей *rs1799983* був вірогідно пов'язаний з розвитком захворювання ($\chi^2=5,82$; $p=0,016$). Наявність у генотипі мінорного алеля *T* збільшувало у 1,6 рази шанси

розвитку ЦД2Т (ВШ=1,59; 95% ВІ 1,09-2,32). Зв'язок з захворюванням за домінантною моделлю успадкування (G/G проти $G/T+T/T$) показав, що патогенна дія *rs1799983* проявлялась за умов наявності у генотипі мінорного алеля T (ВШ=1,92; 95% ВІ 0,94-3,93; $p=0,045$). Наявність алеля T сприяла декомпенсації ЦД2Т за ступенем глікування білка (більшим рівнем HbA1c), погіршенню функції нирок (збільшенням рівню у крові креатиніну, альбумінурії та зменшенням клубочкової фільтрації), що могло бути пов'язаним з меншим рівнем у крові eNOS. Саме це обумовлювало вплив алеля T на наявність нефропатії за швидкістю клубочкової фільтрації ($\chi^2=8,00$; $p=0,005$) і за рівнем альбумінурії ($\chi^2=4,81$; $p=0,028$) та обґрунтовувало її вплив на артеріальну гіпертензію ($\chi^2=4,74$; $p=0,029$).

Встановлено, що розподіл алелей *rs1800629* гена $TNF\alpha$ також був вірогідно пов'язаний з розвитком захворювання ($\chi^2=5,91$; $p=0,015$). Мінорний алель A збільшував у 1,7 рази шанси розвитку ЦД2Т (ВШ=1,71; 95% ВІ 1,11-2,65). Зв'язок з захворюванням за домінантною моделлю успадкування (G/G проти $G/A+A/A$) довів, що патогенна дія *rs1800629* проявлялась саме за умов наявності у генотипі мінорного алеля A (ВШ=1,87; 95% ВІ 1,10-3,18; $p=0,020$). Наявність алеля A сприяла зменшенню клубочкової фільтрації, що пояснювало зв'язок *rs1800629* із розвитком нефропатії ($\chi^2=6,38$; $p=0,041$). Це було обумовлено розвитком ЕДФ з високими рівнями у крові $TNF\alpha$ ($p<0,001$), ET1 ($p=0,026$) і NOx ($p<0,001$).

Поліморфізми генів ендотелінових рецепторів мали зв'язок з розвитком ЦД2Т: для *rs6842241* гена $EDNRA$ підвищення ризику (ВШ=1,87; 95% ВІ 1,20-2,92) було асоційовано з мінорним алелем A ($\chi^2=5,91$; $p=0,005$); для *rs5351* гена $EDNRB$ (ВШ=1,54; 95% ВІ 1,05-2,25) – з предковим алелем C ($\chi^2=4,94$; $p=0,026$). Наявність цих алелей сприяла достеменно більш вищому рівню ET1 у крові ($p<0,001$) та більшій вираженості ЕДФ за результатами проби РЛК ($p<0,05$). Поліморфізми генів ендотелінових рецепторів мали значення для розвитку ускладнень ЦД2Т: *rs6842241* – для артеріальної гіпертензії, а *rs5351* – для сенсорної полінейропатії і нефропатії (для всіх випадків $p<0,001$). При цьому алель ризику A *rs6842241* сприяв більшим величинам ІМТ, систолічного і діастолічного артеріального тисків, ІТХ та рівню у крові тригліцеридів у порівнянні з алелем C (для всіх випадків $p<0,001$). Носії алеля ризику C *rs5351* на час залучення до програми дослідження хворіли на три роки довше, ніж носії алеля T ($p=0,006$) та мали більший ІТХ ($p<0,001$); у них були більші рівні у крові сечовини і креатиніну, альбумінурії та менша швидкість клубочкової фільтрації, ніж у носіїв алеля T ($p<0,05$).

Такі дані підтвердили наявність достеменного впливу генетичних поліморфізмів на тяжкість перебігу ЦД2Т (див. рис. 1). Виходячи з цього, були розраховані ймовірності розвитку та межові значення для позитивного прогнозу діабетичних ускладнень. Ретинопатія визначалась генотипом *rs1800629* і *rs5351* ($\chi^2=13,50$; $p=0,001$), полінейропатія – генотипом *rs1799983* і *rs5351* ($\chi^2=20,19$; $p=4,14e-05$), діабетична нефропатія за швидкістю

клубочкової фільтрації – *rs1799983*, *rs1800629* і *rs5351* ($\chi^2=53,55$; $p=0,0e-01$), діабетична нефропатія за рівнем альбумінурії і артеріальна гіпертензія – *rs1799983*, *rs6842241* і *rs5351* ($\chi^2=47,34$; $p=0,0e-01$ та $\chi^2=36,30$; $p=1,0e-07$, відповідно), макроангіопатія нижніх кінцівок – *rs1799983* і *rs1800629* ($\chi^2=8,50$; $p=0,014$). Правильність прогнозів була на рівні 62,8 % - 79,6 %. В цілому, комбінації генотипів, які містили ризикові алелі характеризувались високою ймовірністю розвитку ускладнення, тоді як комбінації з перевагою протективних алелей – ймовірністю нижчою за межеве значення.

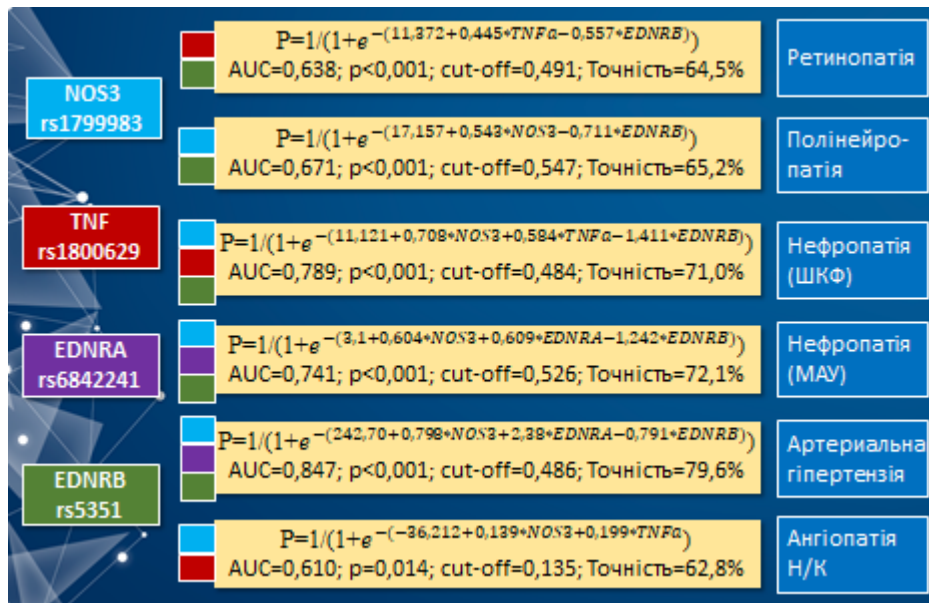


Рис. 1. Регресійні моделі прогнозу ускладнень за поліморфізмами генів *NOS3*, *TNF α* , *EDNRA* і *EDNRB*. Для наочності презентації маленькими прямокутниками зазначені поліморфізми, що мали вплив на розвиток діабетичних ускладнень, колір яких відповідає кольору великих прямокутників означених генетичних поліморфізмів.

Була розроблена математична модель прогнозу тяжкості перебігу ЦД2Т на підставі ІТХ, яка включала значущі показники комбінацій генотипів та маркерів ЕДФ, які за питомим внеском розподілились таким чином: $ET1 > NOx > rs5351 > rs6842241 > rs1799983 > TNF\alpha$ ($F=48,50$; $p<0,001$). При цьому *ET1*, *TNF α* , *rs1799983*, *rs6842241* демонстрували прямий, а *NOx* і *rs5351* – зворотний зв'язок з ІТХ.

Математичне відображення моделі прогнозу тяжкості перебігу ЦД2Т:

$$ITX = 3,99 \cdot ET1 - 2,01 \cdot NOx + 0,03 \cdot TNF\alpha + 0,49 \cdot NOS3 + 0,80 \cdot EDNRA - 1,23 \cdot EDNRB \quad (2)$$

де: *ET1*, *NOx*, і *TNF α* – вміст у крові відповідних чинників ЕДФ;

NOS3, *EDNRA*, *EDNRB* – індикаторні значення генотипів.

Модель за формулою 2 мала коефіцієнт множинної кореляції $R=0,917$, коефіцієнт детермінації $R^2=0,841$. Значення ІТХ менше ніж 2,704 ум.од. відповідали повільному, від 2,704 до 7,025 ум.од. – помірному та більше ніж 7,025 ум.од. – швидкому прогресуванню захворювання.

ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі представлено теоретичне узагальнення результатів і досягнуто сучасне рішення актуального наукового завдання – на підставі клінічних, лабораторних та математичних методів дослідження визначено роль генетичного поліморфізму у розвитку ендотеліальної дисфункції та розроблені моделі прогнозування розвитку судинних ускладнень при цукровому діабеті 2 типу.

1. У всіх обстежених хворих наявна гіперглікемія з перевищенням вмісту у крові глюкози у 2,4-3,3 рази ($p < 0,001$) і HbA1c 1,5-2,0 рази ($p < 0,001$) в порівнянні з контролем. Рівень вуглеводного обміну у 1-й групі пацієнтів був компенсований, у 2-й і 3-й групах – некомпенсований. Для хворих 1-ї і 2-ї груп властива гіперінсулінемія, 3-ї групи – гіпоінсулінемія із зниженням функції бета-клітин підшлункової залози. Пацієнти 3-ї групи були в середньому на 6 років старшими та довше (на 8,5 років) хворіли ($p < 0,001$), мали зайву вагу або ожиріння (ІМТ від 28,4 кг/м² до 35,0 кг/м²) на тлі гіпертригліцеридемії. У хворих всіх груп спостерігалась інсулінорезистентність, лептинорезистентність і гіперлептинемія.

2. Серед діабетичних ускладнень найчастіше діагностувалась сенсорна полінейропатія (88,1 %), нефропатія (84,2 %), ретинопатія (78,3 %) та артеріальна гіпертензія (46,7 %). По групах значуще збільшувалась частота та ступені ретинопатії ($p < 0,001$), нефропатії за альбумінурією ($p = 0,032$), макроангіопатії нижніх кінцівок та артеріальної гіпертензії ($p < 0,001$). Запропонований індекс тяжкості хвороби - ІТХ, величина якого відображає тяжкість перебігу захворювання – прямо залежить від кількості та тяжкості ускладнень і зворотно – від віку пацієнта.

3. Вміст у крові ET1 і NOx хворих перевищують контроль у 3,7-4,7 рази ($p < 0,001$) і 1,4-1,5 рази ($p < 0,001$), відповідно. Найбільшого приросту сягають рівні TNF α (у 4,2-6,5 рази; $p < 0,001$) і ДК (у 2,3-2,7 рази; $p < 0,001$). Вміст eNOS у крові в групах хворих є нижчим за контроль (у 1,3-1,9; $p < 0,001$). Результати регресійного аналізу свідчать, що ET1 обумовлює високу глікемію, альбумінурію, підвищує ступені декомпенсації діабету і нефропатії. Накопичення у крові NOx впливає на зниження швидкості клубочкової фільтрації та погіршення функції нирок. Рівні TNF α і ДК є факторами, котрі комплексно впливають на всі ключові показники ЦД2Т. Чинники ендотеліальної дисфункції визначають розвиток діабетичних ускладнень: ET1 прямо впливає на розвиток всіх ускладнень (крім макроангіопатії нижніх кінцівок); TNF α визначає розвиток ретинопатії, нефропатії за швидкістю клубочкової фільтрації і артеріальної гіпертензії; накопичення у крові NOx сприяє розвитку макроангіопатії нижніх кінцівок.

4. Розподіл алелей *rs1799983* гена *NOS3* асоційований з розвитком ЦД2Т ($\chi^2 = 5,82$; $p = 0,016$). Наявність у генотипі мінорного алеля *T* збільшує у 1,6 рази шанси розвитку захворювання (ВШ=1,59; 95% ВІ 1,09-2,32), сприяє декомпенсації діабету за рівнем HbA1c та погіршенню функції нирок (згідно з вмістом у крові креатиніну, альбумінурією та клубочковою фільтрацією) і

корелює з меншим вмістом у крові NOx ($p < 0,001$) та eNOS ($p < 0,001$). Алель *T* впливає на наявність нефропатії та артеріальної гіпертензії.

5. Розподіл алелей *rs1800629* гена *TNF α* асоційований з розвитком ЦД2Т ($\chi^2=5,91$; $p=0,015$). Наявність у генотипі мінорного алеля *A* збільшує у 1,7 рази шанси розвитку захворювання (ВШ=1,71; 95% ВІ 1,11-2,65), сприяє зменшенню клубочкової фільтрації і розвитку нефропатії та обумовлює розвиток ендотеліальної дисфункції з високими рівнями у крові TNF α ($p < 0,001$), ET1 ($p=0,026$) і NOx ($p < 0,001$).

6. Поліморфізми генів ендотелінових рецепторів впливають на розвиток ЦД2Т: для *rs6842241* гена *EDNRA* підвищення ризику (ВШ=1,87; 95% ВІ 1,20-2,92) асоційовано з мінорним алелем *A* ($\chi^2=5,91$; $p=0,005$); для *rs5351* гена *EDNRB* (ВШ=1,54; 95% ВІ 1,05-2,25) – з предковим алелем *C* ($\chi^2=4,94$; $p=0,026$). Наявність цих алелей сприяє достеменно вищому рівню ET1 у крові ($p < 0,001$). Поліморфізми генів ендотелінових рецепторів мають значення: *rs6842241* для розвитку артеріальної гіпертензії; *rs5351* – сенсорної полінейропатії і нефропатії. Алель *A* *rs6842241* сприяє вищим значенням ІМТ, систолічного і діастолічного артеріального тисків, ІТХ та рівню у крові тригліцеридів у порівнянні з алелем *C*. Алель ризику *C* *rs5351* в генотипі хворих підвищує тривалість захворювання, показник ІТХ, рівні сечовини і креатиніну у крові, альбумінурію та зменшую швидкість клубочкової фільтрації у порівнянні з наявністю алеля *T*.

7. Розраховано ймовірності розвитку та межові значення позитивного прогнозу для всіх ускладнень ЦД2Т. Точність прогнозів складає 62,8 %-79,6 %. Розроблено математичну модель прогнозу тяжкості перебігу ЦД2Т за індексом тяжкості хвороби, яка включає значущі комбінації генотипів та чинники ендотеліальної дисфункції, які за питомим внеском розподіляються наступним чином: ET1 > NOx > *rs5351* > *rs6842241* > *rs1799983* > TNF α ($F=48,50$; $p < 0,001$).

ПРАКТИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ

1. Побудовано логістичні регресійні моделі прогнозування розвитку ускладнень в залежності від вмісту у крові чинників ендотеліальної дисфункції: для ретинопатії мали значення ET1 і TNF α ; для макроангіопатії нижніх кінцівок – NOx і TNF α ; для полінейропатії – ET1; для нефропатії за швидкістю клубочкової фільтрації – ET1 і TNF α ; для нефропатії за альбумінурією – ET1 і eNOS; для артеріальної гіпертензії – ET1, NOx і TNF α ; точність прогнозу від 60,5% (для полінейропатії) до 90,8% (для нефропатії за альбумінурією).

2. Розраховано критичні (сигнальні) рівні у крові чинників ендотеліальної дисфункції: вміст ET1 в крові вищий за 1,990 фмоль/мл підтверджує розвиток нефропатії за рівнем альбумінурії, а вищий за 2,309 фмоль/мл – інших ускладнень. Вміст TNF α у крові вищий ніж 102,0 пг/мл і 105,1 пг/мл характеризує розвиток ретинопатії та нефропатії, відповідно. Розвиток нефропатії за рівнем альбумінурії, крім ET1, підтверджується зменшенням вмісту eNOS у крові нижче за 250,4 пг/мл та ДК - нижче за 5,368 Од/мл.

3. Носії ризикових алелей мають вищі шанси розвитку ЦД2Т та його ускладнень. Розраховано ймовірності розвитку та межові значення позитивного прогнозу для всіх діабетичних ускладнень. Розроблено математичну модель прогнозу тяжкості перебігу захворювання за ІТХ, яка включає значущі показники комбінацій генотипів та чинників ендотеліальної дисфункції. Прогресування діабету, розраховане за ймовірністю прогнозу, розцінюється як повільне при ІТХ менше за 2,7 ум.од., помірне – 2,7-7,0 ум.од. і швидке – 7,1-11,3 ум.од.

СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Зябліцев СВ, Чернобривцев ОП, Зябліцев ДС, Стародубська ОО., Абряхімова ЦБ. Патогенетична роль ендотеліну-1 та поліморфізму його рецепторів при цукровому діабеті 2 типу. *Фізіол журн.* 2019;65(2):22-30. *(Особистий внесок здобувача полягає у проведенні лабораторних досліджень, статистичній обробці результатів, формулюванні висновків і підготовці матеріалів статті до публікації).*

2. Chernobryvtsev OP. The endothelial dysfunction factors in diabetes mellitus 2 type. *Journal of Education, Health and Sport.* 2019;9(1):410-6. *(Особистий внесок здобувача полягає у проведенні лабораторних досліджень, статистичній обробці результатів, формулюванні висновків і підготовці матеріалів статті до публікації).*

3. Зябліцев СВ, Чернобривцев ОП, Зябліцев ДС. Значення фактору некрозу пухлин альфа у механізмах розвитку нефропатії при цукровому діабеті 2 типу. *Клін ендокр та ендокр хір.* 2019; 65(1):72-80. *(Особистий внесок здобувача полягає у проведенні лабораторних досліджень, статистичній обробці результатів, формулюванні висновків і підготовці матеріалів статті до публікації).*

4. Зябліцев СВ, Чернобривцев ОП, Зябліцева МВ. Структура ускладнень цукрового діабету 2 типу у залежності від його тяжкості. *Актуальні проблеми транспортної медицини.* 2019;55(1):130-7. *(Особистий внесок здобувача полягає у проведенні лабораторних досліджень, статистичній обробці результатів, формулюванні висновків і підготовці матеріалів статті до публікації).*

5. Зябліцев СВ, Чернобривцев ОП, Зябліцев ДС. Поліморфізм rs1800629 гена TNF α при цукровому діабеті 2 типу. Зв'язок з розвитком нефропатії. *Международн ендокр журн.* 2019;15(1):24-30. *(Особистий внесок здобувача полягає у проведенні лабораторних досліджень, статистичній обробці результатів, формулюванні висновків і підготовці матеріалів статті до публікації).*

6. Ziablitsev SV, Uzvenko TU, Chernobrivtsev OP, Grishov AA, Palamar S, Ziablitsev DS. Influence of rs1137101 gene polymorphism of leptin receptor on the development of diabetes mellitus type 2 and obesity. *Фізіол журн.* 2018;64(6):3-8. *(Особистий внесок здобувача полягає у проведенні лабораторних досліджень, статистичній обробці результатів).*

7. Зябліцев СВ., Чернобривцев ОП., Зябліцев ДС. Показники

ендотеліальної дисфункції при цукровому діабеті 2-го типу як визначальні чинники розвитку ускладнень. *Международн ендокр журн.* 2018;14(7):661-7. (Особистий внесок здобувача полягає у проведенні лабораторних досліджень, статистичній обробці результатів, формулюванні висновків і підготовці матеріалів статті до публікації).

8. Зябліцев СВ, Чернобривцев ОП, Зябліцев ДС, Тарасенко СО. Зв'язок поліморфізму rs1799983 гена NOS3 з цукровим діабетом 2 типу та розвитком його ускладнень. *Клін ендокр та ендокр хір.* 2018;64(4):35-44. (Особистий внесок здобувача полягає у проведенні лабораторних досліджень, статистичній обробці результатів, формулюванні висновків і підготовці матеріалів статті до публікації).

9. Зябліцев СВ, Панова ТІ, Чернобривцев ОП. Зв'язок чинників ендотеліальної дисфункції з тяжкістю цукрового діабету 2 типу. *Мед наука України.* 2018;1-2:34-39. (Особистий внесок здобувача полягає у проведенні лабораторних досліджень, статистичній обробці результатів, формулюванні висновків і підготовці матеріалів статті до публікації).

10. Зябліцев СВ, Могилевський СЮ, Бушуєва ОВ, Чернобривцев ОП. Можлива роль поліморфізмів rs759853 і rs9640883 гена AKR1B1 при діабетичній ретинопатії і цукровому діабеті 2 типу. *Клін ендокр та ендокр хір.* 2017;58(2):34-8. (Особистий внесок здобувача полягає у проведенні лабораторних досліджень, статистичній обробці результатів).

11. Зябліцев СВ, Чернобривцев ПА, Чернобривцев ОП, Антонов ЄВ. Вплив поліморфізму rs1137101 гена рецептора лептину на розвиток цукрового діабету 2-го типу. *Експ і клінік мед.* 2016;71(2):86-90. (Особистий внесок здобувача полягає у проведенні лабораторних досліджень, статистичній обробці результатів).

12. Зябліцев СВ, Ларін ОС, Новосельська ВВ, Дашук ТІ, Гаврюшенко ЛВ, Чернобривцев ОП. Управління технологічними процесами та критерії їх оцінки на етапах виконання лабораторних досліджень. *Клін ендокр та ендокр хір.* 2015;49(1):55-61. (Особистий внесок здобувача полягає у розробці критеріїв для оцінки лабораторних досліджень, статистичній обробці результатів).

ПУБЛІКАЦІЇ, ЯКІ СВДЧАТЬ ПРО АПРОБАЦІЮ ДІСЕРТАЦІЇ

1. Zyablitsev SV, Chernobryvtsev OP. Role of Endotelin-1 and polymorphism of its receptors in type 2 diabetes mellitus and its complications. Матеріали XX-го з'їзду Українського фізіологічного товариства ім. П.Г. Костюка з міжнародною участю, присвяченого 95-річчю від дня народження академіка П.Г. Костюка. 2019 р., м. Київ. *Фізіол журн.* 2019; 65(3):101. *Форма участі – публікація тез, усна доповідь.*

2. Зябліцев СВ, Чернобривцев ОП Вплив поліморфізмів rs1799983 гена NOS3 та rs1800629 гена TNFA на розвиток ендотеліальної дисфункції у хворих на цукровий діабет 2 типу. Тези VII Пленуму Українського наукового товариства патологістів та науково-практична конференція «Інтегративні механізми патологічних процесів: від експериментальних досліджень до

клінічної практики», присвячені 110-річчю з дня народження члена-кореспондента АМН СРСР, професора М.Н. Зайка. 10-12 жовтня 2018 р., м. Полтава. Полтава, 2018:32-3. *Форма участі – публікація тез, усна доповідь.*

3. Зяблицев СВ, Чернобривцев ОП, Гришов АА, Паламар С. Поліморфізм генів проліфератора пероксисом гамма 2 типу (PPARG) та рецептора лептину (LEPR) обумовлюють розвиток цукрового діабету 2 типу. Бюл. мат-лів научн. конф. XVII читання ім. В.В. Подвисоцького. 24-25 травня 2018 р., м. Одеса. Одеса: УкрНДІ медицини транспорту. 2018:93-4. *Форма участі – публікація тез, участь у постерній сесії.*

4. Зяблицев СВ, Чернобривцев ОП. Значення ендотеліну-1 у розвитку інсулінорезистентності і ендотеліальної дисфункції при цукровому діабеті 2 типу. Бюл. мат-лів научн. конф. XVII читання ім. В.В. Подвисоцького. 24-25 травня 2018 р., м. Одеса. Одеса: УкрНДІ медицини транспорту. 2018:97-8. *Форма участі – публікація тез, участь у постерній сесії.*

5. Зяблицев СВ, Чернобривцев ОП, Піщуліна МІ. Варіабельність генів VEGF, NOS3, ІІ-1b та TNF α при цукровому діабеті 2 типу. Бюл. мат-лів научн. конф. XVI читання ім. В.В. Подвисоцького. 18-19 травня 2017 р., м. Одеса. Одеса: УкрНДІ медицини транспорту. 2017:137-8. *Форма участі – публікація тез, участь у постерній сесії.*

6. Зяблицев СВ, Чернобривцев ОП. Роль поліморфізму rs1799983 гена NOS3 у розвитку ендотеліальної дисфункції при цукровому діабеті 2 типу. Мат-ли конф. присвяченій 105-й річниці від дня народження професора Я.Д. Киршенבלата. 5-6 жовтня 2017 р., м. Чернівці. *Клінічна та експериментальна патологія.* 2017;61(3):44. *Форма участі – публікація тез, усна доповідь.*

7. Зяблицев СВ, Чернобривцев ОП, Борис РМ. Поліморфізм генів, що мають відношення до розвитку ендотеліальної дисфункції, при цукровому діабеті 2 типу. Тези доп. VII нац. конгресу патофізіологів України з міжнародною участю «Патофізіологія і фармація: шляхи інтеграції». 5-7 жовтня 2016 р., м. Харків. Харків: Вид-во НФаУ. 2016:92. *Форма участі – публікація тез, усна доповідь.*

АНОТАЦІЯ

Чернобривцев О.П. Роль генетичного поліморфізму у розвитку ендотеліальної дисфункції при цукровому діабеті 2-го типу. – на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата медичних наук за спеціальністю 14.03.04 «Патологічна фізіологія» – Інститут фізіології Національної академії наук України імені О.О. Богомольця. Київ, 2019.

Дисертацію присвячено дослідженню ролі генетичного поліморфізму (rs1799983 гена NOS3, rs1800629 гена TNF α , rs6842241 гена EDNRA і rs5351 гена EDNRB) у розвитку ендотеліальної дисфункції (ЕДФ) при цукровому діабеті 2-го типу (ЦД2Т). Запропоновано оригінальний індекс тяжкості перебігу хвороби (ІТХ), величина якого прямо залежала від кількості та тяжкості ускладнень і зворотно – від віку пацієнта. За величиною ІТХ розроблена модель прогнозу ЦД2Т, яка включала значущі комбінації

генотипів та маркери ЕДФ, які за питомим внеском розподілились таким чином: ендотелін 1 > стабільні метаболіти NO > *rs5351* > *rs6842241* > *rs1799983* > TNF α . Прогресування діабету розцінювалось як повільне при ІТХ менше за 2,7 ум.од., помірне – 2,7-7,0 ум.од. і швидке – 7,1-11,3 ум.од. Показана роль ендотеліну-1 у збільшенні глікемії, альбумінурії, підвищенні ступеню декомпенсації діабету і нефропатії; вплив стабільних метаболітів NO на зниження швидкості клубочкової фільтрації та погіршення функції нирок; вплив TNF α і дієнових кон'югатів на всі ключові показники ЦД2Т. Розраховані ймовірності розвитку та їх межові значення для позитивного прогнозу діабетичних ускладнень: ретинопатія визначалась генотипом *rs1800629* і *rs5351*, полінейропатія – *rs1799983* і *rs5351*, діабетична нефропатія за швидкістю клубочкової фільтрації – *rs1799983*, *rs1800629* і *rs5351*, діабетична нефропатія за рівнем альбумінурії і артеріальна гіпертензія – *rs1799983*, *rs6842241* і *rs5351*, макроангіопатія нижніх кінцівок – *rs1799983* і *rs1800629*.

Ключові слова: цукровий діабет 2-го типу, ендотеліальна дисфункція, генетичний поліморфізм, *rs1799983* NOS3, *rs1800629* TNF α , *rs6842241* EDNRA, *rs5351* EDNRB.

АННОТАЦІЯ

Чернобривцев А.П. Роль генетического полиморфизма в развитии эндотелиальной дисфункции при сахарном диабете 2-го типа. – на правах рукописи.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 14.03.04 «Патологическая физиология» – Институт физиологии Национальной академии наук Украины имени А.А. Богомольца. Киев, 2019.

Диссертация посвящена исследованию роли генетических полиморфизмов (*rs1799983* гена NOS3, *rs1800629* гена TNF α , *rs6842241* гена EDNRA и *rs5351* гена EDNRB) в развитии эндотелиальной дисфункции (ЭДФ) при сахарном диабете 2-го типа (СД2Т). Предложен оригинальный индекс тяжести болезни (ИТБ), величина которого напрямую зависела от количества и тяжести осложнений и обратно – от возраста пациента. По величине ИТБ разработана модель прогноза СД2Т, которая включала значимые комбинации генотипов и маркеры ЭДФ, которые по удельному весу распределились следующим образом: эндотелін 1 > стабільні метаболіти NO > *rs5351* > *rs6842241* > *rs1799983* > TNF α . Прогресирование диабета расценивалось как медленное при ИТБ меньше 2,7 у.е., умеренное – 2,7-7,0 у.е. и быстрое – 7,1-11,3 у.е. Показаны роль эндотелина-1 в прогрессировании гликемии, альбуминурии, декомпенсации диабета и нефропатии; влияние стабильных метаболитов NO на снижение скорости клубочковой фильтрации и ухудшение функции почек; влияние TNF α и диєнових кон'югатів на все ключевые показатели СД2Т. Рассчитаны вероятности развития и их предельные значения для положительного прогноза диабетических осложнений: ретинопатія определялась генотипом *rs1800629* и *rs5351*, полінейропатія - *rs1799983* и *rs5351*, діабетическая

нефропатия, диагностированная по скорости клубочковой фильтрации – *rs1799983*, *rs1800629* и *rs5351*, диабетическая нефропатия, диагностированная по уровню альбуминурии и артериальная гипертензия – *rs1799983*, *rs6842241* и *rs5351*, макроангиопатия нижних конечностей – *rs1799983* и *rs1800629*.

Ключевые слова: сахарный диабет 2-го типа, эндотелиальная дисфункция, генетический полиморфизм, *rs1799983 NOS3*, *rs1800629 TNF α* , *rs6842241 EDNRA*, *rs5351 EDNRB*.

SUMMARY

Chernobryvtsev OP. The role of genetic polymorphism in the development of endothelial dysfunction in type 2 diabetes mellitus. – manuscript.

Dissertation for obtaining a scientific degree of the candidate of medical sciences in specialty 14.03.04 "Pathological physiology" – Bogomolets Institute of Physiology of the National Academy of Sciences of Ukraine. Kiev, 2019.

The dissertation is devoted to the study of the role of genetic polymorphism (*rs1799983* gene *NOS3*, *rs1800629* gene *TNF α* , *rs6842241* gene *EDNRA* and *rs5351* gene *EDNRB*) in the development of endothelial dysfunction in type 2 diabetes mellitus (T2DM). Supplemented and specified data on flow and presence of complications in patients with diabetes mellitus with different severity: with an average degree of diabetes occurred hyperinsulinemia and insulin resistance, at a severe degree - hypoinsulinemia and decreased function of beta cells. Excessive body weight or obesity have been associated with hypertriglyceridemia, leptin resistance and hyperleptinemia. Among diabetic complications, the most frequent was sensory polyneuropathy (88.1%), nephropathy (84.2%), retinopathy (78.3%) and arterial hypertension (46.7%). The original index of severity of the disease (IDS) was proposed, the magnitude of which directly depended on the number and severity of complications, and vice versa – from the age of the patient. According to IDS was developed prediction model of diabetes mellitus, which included meaningful combinations of genotypes and markers of endothelial dysfunction, which were distributed in this way according to the specific contribution: endothelin 1 > NOx > *rs5351* > *rs6842241* > *rs1799983* > *TNF α* . The progression of diabetes was seen as slow at IDS level less than 2.7 units, moderate – 2.7-7.0, and fast – 7.1-11.3. The role of endothelin-1 in increasing glycemia, albuminuria, increasing the degree of decompensation of diabetes and nephropathy is shown; the effect of NOx on reducing the glomerular filtration rate and the deterioration of the function of the kidneys; the influence of *TNF α* and diene conjugates on all key parameters of T2DM.

In the cohort of Ukrainian patients, the distribution of alleles *rs1799983* of the *NOS3* gene was associated with the development of the disease ($\chi^2=5.82$; $p=0.016$). The presence of the minor allele *T* in the genotype increased chances of development of T2DM by 1.6 times (OR=1.59; 95% CI 1.09-2.32), contributed decompensation diabetes by HbA1c levels and worsening renal function (by blood levels of creatinine, albuminuria and glomerular filtration rate) and was associated

with lower blood levels of NO_x and eNOS. The distribution of alleles *rs1800629* of the *TNF α* gene was associated with the development of the disease ($\chi^2=5.91$; $p=0.015$). Minor allele A increased the chances of T2DM in 1.7 times (OR=1.71, 95% CI 1.11-2.65) and contributed to the development of nephropathy ($\chi^2=6.38$; $p=0.041$). Endothelin receptor gene polymorphisms were associated with the development of the disease: for *rs6842241* of the *EDNRA* gene, the increased risk was associated with the minor allele A ($p=0.005$); for *rs5351* of the *EDNRB* gene with an ancestral C allele ($p=0.026$). The presence of these alleles contributed to a significantly higher level in endothelin-1 in blood ($p < 0.001$). Polymorphisms of genes of endothelin receptors had significance ($p < 0.001$) for development: *rs6842241* – arterial hypertension, *rs5351* – sensory polyneuropathy and nephropathy. The estimated probability of boundary value and a positive outlook for all diabetic complications: retinopathy was defined by genotype *rs1800629* and *rs5351*, polyneuropathy – *rs1799983* and *rs5351*, diabetic nephropathy by glomerular filtration rate – *rs1799983*, *rs1800629* and *rs5351*, diabetic nephropathy by albuminuria levels and hypertension – *rs1799983*, *rs6842241* and *rs5351*, lower rates of macroangiopathy of lower extremities – *rs1799983* and *rs1800629*.

Key words: type 2 diabetes mellitus, endothelial dysfunction, genetic polymorphism, *rs1799983 NOS3*, *rs1800629 TNF α* , *rs6842241 EDNRA*, *rs5351 EDNRB*.

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

ДК	– дієнові кон'югати;
ЕДФ	– ендотеліальна дисфункція;
ІМТ	– індекс маси тіла;
ІТХ	– індекс тяжкості хвороби;
РЛК	– проба Румпеля-Леєде-Кончаловського;
ЦД2Т	– цукровий діабет 2-го типу;
<i>EDNRA</i>	– ген рецептора ендотеліну типу А;
<i>EDNRB</i>	– ген рецептора ендотеліну типу В;
eNOS	– ендотеліальна синтаза оксида азоту;
ЕТ1	– ендотелін-1;
F	– критерій Фішера;
HbA1c	– глікований гемоглобін;
<i>NOS3</i>	– ген ендотеліальної NO-синтази;
NO _x	– стабільні метаболіти оксиду азоту;
p	– вірогідність нульової гіпотези;
TNF α	– фактор некрозу пухлин- α ;
<i>TNFα</i>	– ген фактора некрозу пухлин – α ;
χ^2	– критерій хі-квадрат.

Підписано до друку 18.07.2019 р. Формат 60 x 84/16
Папір офсетний. Друк цифровий
Обсяг 0,9 ум.-друк. арк. Наклад 100 прим. Зам. № П-2019-590

Надруковано у ЦОП «Глобус» ФОП Кравченко Я.О.
Свідоцтво № ДК 6078 від 21.03.2018 р.
Тел. (044) 561-95-31, (067) 506-57-55, (050) 570-65-55